

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen

Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung von Bromdiaethylacetylcarbamid im Harn

Inaugural = Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Kurt Deisel

aus Sulzbach-Rosenberg

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen

Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Untersuchungen zur Frage der
Ausscheidung von
Bromdiaethylacetylcarbamid im Harn

Inaugural = Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Kurt Deisel

aus Sulzbach-Rosenberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen



Dekan: Professor Dr. C. Korth

Referent: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1955

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	5
B. Eigenschaften des Bromdiaethylcarbamids (Adalin)	7
I. Chemische und physikalische Eigenschaften	7
II. Klinische Merkmale	7
III. Verteilung im Körper und Ausscheidung	
- Besprechung der Literaturangaben -	8
IV. Untersuchungsergebnisse von Walz	14
C. Eigene Versuche	15
I. Versuche mit Adalinsubstanz	15
1. Schmelzpunktbestimmung und Extraktions-	
versuche aus wässriger Lösung	15
2. Extraktionsversuch nach Zusatz von Adalin	
zu biologischem Material	15
II. Versuche mit Harnextrakten	15
1. Vorversuche zur Extraktionstechnik	15
2. Gewinnung der trockenen Extraktrückstände	16
3. Sublimation der Vakuumsublimat	17
4. Untersuchung der Vakuumsublimat	19
a) Hippursäure	19
b) Benzoesäure	20
5. Besprechung der Literaturangaben über	
Hippursäure und Benzoesäure im Harn	21
III. Versuche zum Nachweis von spezifischen Adalin-	
ausscheidungsprodukten im Urin	22
1. Äther- und Chloroformausschüttelung	
des durch Gefrieren eingeeengten Urins	22
a) Isolierung von Harnstoff	23
b) Isolierung einer weiteren Substanz,	
wahrscheinlich Harnsäure	24
c) Isolierung einer unbekannten Substanz	24
2. Extraktion des durch Eintrocknung im Luftstrom	
eingeeengten Urins	25
3. Ätherausschüttelung des angesäuerten, nicht ein-	
geengten Urins — Isolierung des für Adalin	
charakteristischen Abbauproduktes α -Äthyl- α -	
Oxybuttersäure —	26
D. Zusammenfassung	28
E. Literaturangaben	31

A. Einleitung

Für die gerichtliche Medizin hat der Nachweis von Giften im Harn eine große Bedeutung. In manchen Fällen ist der Harn das einzige erreichbare Material, z. B. wenn der Patient die Vergiftung überlebt und selbst keine Angaben macht oder machen kann, oder wenn die Sektion der Leiche aus irgendwelchen Gründen nicht möglich ist. In solchen Fällen kann die Untersuchung der Körperausscheidungen wie Urin, Kot, Schweiß zu einer Klärung führen.

Der Nachweis im Urin ist dann einfach, wenn das Gift nach der Körperpassage durch die Niere unverändert in größeren Mengen ausgeschieden wird; es kommt dann nur darauf an, die nötigen physikalischen oder chemischen Nachweismethoden zu finden. Besonders einfach ist der Nachweis, wenn es eine für das jeweilige Gift ganz spezifische, chemische Nachweismethode gibt; dadurch können noch sehr kleine Mengen oder Spuren von Gift nachgewiesen werden. Anders liegen die Verhältnisse, wenn das Gift im Organismus chemisch verändert oder abgebaut wird. Diese Produkte zu erkennen kann sehr schwierig sein.

Die Möglichkeiten der chemischen Einwirkung des Organismus auf ein Medikament oder Gift sind vielfältig: In Magen und Darm werden viele Substanzen oft erst in resorbierbare Form gebracht, wenn sie es nicht schon vorher waren. Die Art der chemischen Einwirkung und des resorbierbaren Produktes ist leider nicht immer feststellbar. Die Verhältnisse sind hier schon so kompliziert, daß sie nicht ohne weiteres durch Reagenzglasversuche nachgeahmt werden können. Weitere chemische Veränderungen sind möglich beim Übertritt von der Darmwand in das Blut, im Blut selbst und vor allem in der Leber, weiterhin in den verschiedenen Körperorganen und Geweben und schließlich in der Niere, wo viele Stoffe erst in ausscheidungsfähige Form gebracht werden. Die Mittel und Wege des Organismus vor allem im intermediären Stoffwechsel sind so zahlreich, daß man nur bei wenigen Stoffen in der Lage ist, den Werdegang eines Medikamentes von seiner Aufnahme bis zur Ausscheidung der Endprodukte oder der vollkommenen Zerstörung im Körper nachzuweisen. Selbst dort, wo die ausgeschiedenen Spaltprodukte bekannt sind, sind die Umwege, die der Organismus oft beschreitet, nicht immer ersichtlich. Hinzu kommt, daß sich manchmal noch im Urin, wo sich das ausgeschiedene Produkt in einer wässrigen Lösung befindet, chemische Umwandlungen vollziehen, je nach der Reaktionslage, der Konzentration, der Temperatur des Urins, sowie je nach seiner Zusammensetzung und seinem Gehalt an pathologischen Stoffen, wie z. B. Bakterien. Leider ist die Bearbeitung des frisch gelassenen Urins nicht

immer möglich, außerdem sind Veränderungen des Urins schon in der Blase möglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Ausscheidungsverhältnisse des Adalins zu klären und eventuell eine Nachweismethode zu finden. Darüber haben schon zahlreiche Autoren berichtet. Exakte, verwertbare Ergebnisse finden sich nur in den Arbeiten, in denen mittels Brombestimmung gearbeitet wurde, während die wenigen Arbeiten mit dem Versuch, spezifische Adalinspaltprodukte oder unverändertes Adalin im Harn oder in den Geweben nachzuweisen, bisher ohne exakt bewiesene Ergebnisse geblieben sind. Bekanntlich ist der Bromnachweis nicht spezifisch für Adalin: die Schlafmittel Neuronal, Bromural, Abasin enthalten ebenfalls organisch gebundenes Brom; es gibt außerdem zahlreiche Kombinationspräparate, in denen verschiedene der genannten Präparate enthalten sein können. Daneben kommt in vielen Präparaten anorganisches Brom vor.

Über die Chemie, Klinik, Pharmakologie und Toxikologie des Adalins wurde in allen einschlägigen Arbeiten berichtet. Ich verweise vor allem auf die recht ausführlichen Angaben von Walz. Ich werde daher auf eine solche allgemeine Übersicht verzichten und nur die wesentlichsten Merkmale beschreiben, sowie all das erwähnen, was für das Verständnis meiner Versuche notwendig ist.

B. Eigenschaften des Bromdiaethylacetylcarbamids (Adalin)

I. Chemische und physikalische Eigenschaften

Das von der Firma Bayer & Co. hergestellte Adalin ist chemisch Bromdiaethylacetylcarbamid:

Es enthält 33,7 % Brom. Die Beteiligung des Broms an der hypnotischen Wirkung des Adalins ist umstritten. Adalin ist ein weißes, geruchloses, bitter schmeckendes, kristallines Pulver von neutraler Reaktion. Es löst sich in kaltem Wasser nur zu 0,05 %, bedeutend besser dagegen in heißem Wasser. Gut löslich ist es weiterhin in Alkohol, Aceton, Benzol, verdünnter Natronlauge; ziemlich schwer in Petroläther (Bayer & Co.). Adalin sublimiert ab etwa 60° in Form feiner, gebogener Nadeln, die sich bei weiterer Sublimation zu einem strauchartig verzweigten Geflecht vereinigen. Der Schmelzpunkt beträgt nach Rosenmund und Herrmann 117 bis 118°, nach eigener Untersuchung der Tablettensubstanz mittels Mikroschmelzpunktbestimmung auf der Apparatur von L. Kofler 113 bis 114°. Nach der Auskristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln unterscheidet Genot zahlreiche verschiedene Kristallformen.

Handelsformen des Bromdiaethylacetylcarbamids: Folgende mit Adalin identische Präparate sind zum Teil heute noch im In- und Ausland im Handel:

Adormin
Carbromal
Dibroluur
Nyctal
Somben
Tildin.

Adalinhaltige Präparate: u.a. Sekundal
Temagin
Doroma (Bayer).

II. Klinische Merkmale

Das von der Firma Bayer hergestellte Adalin enthält pro Tablette 0,5 g Bromdiaethylacetylcarbamid. Dies ist zugleich die Einzeldosis. Für den nicht an Adalin gewöhnten Organismus genügen meist 0,5 bis 1,0 g Adalin, um einen angenehmen Schlaf von mehreren Stunden zu erreichen. Nach dem Erwachen bestehen keine Nachwirkungen wie z. B. Benommenheit, im Gegenteil, man fühlt sich besonders frisch und leistungsfähig. Dies stellte ich auch bei meinen Versuchen bei mir selbst und anderen Versuchspersonen fest. Einschränkung dazu muß ich allerdings

sagen, daß ich bei einer Erhöhung der Dosis auf 1,5 bis 2,0 g am nächsten Tag benommen war, was jedoch kein großer Nachteil ist, da wie gesagt, für den nichtgewöhnten Menschen 0,5 bis 1,0 g Adalin den gewünschten Erfolg bringen. Ein unangenehmerer Nachteil ist, daß bei länger dauern-dem Adalingebrauch ebenfalls Benommenheit auftreten kann. Ich habe selbst über drei Wochen, allerdings mit Unterbrechungen, jeweils 1,0 g Adalin eingenommen; anfangs ohne Nachwirkungen. Zuletzt nahm ich acht Tage lang hintereinander Adalin, wobei tagsüber eine leichte Benommenheit auftrat. Als ich am letzten Tag 2,0 g = 4 Tabletten auf einmal einnahm, befand ich mich am ganzen folgenden Vormittag in einer Art Dämmerzustand. Am späten Nachmittag und Abend war ich wieder frisch.

Adalin scheint auch zu einer gewissen Gewöhnung zu führen. In der Literatur sind Fälle beschrieben, wo Patienten jahrelang täglich Adalin zu sich nahmen. Um die gewünschte Wirkung zu erzielen, mußten sie schließlich zehn Tabletten und mehr einnehmen, wobei es allerdings zu Symptomen einer chronischen Schlafmittelvergiftung kam.

Was die klinische Brauchbarkeit des Adalins betrifft, kann ich mich den Angaben vieler Kliniker anschließen, daß es ein sehr brauchbares Mittel ist bei Einschlafstörungen verschiedener Genese, solange es nicht längere Zeit eingenommen wird, und solange die Einschlafstörung nicht so stark ist, daß zur Erzielung des gewünschten Effektes die Einzeldosis wesentlich erhöht werden muß. Nach meinen eigenen Erfahrungen sollten nicht mehr als 1,0 g, höchstens 1,5 g auf einmal genommen werden. Eingehendes über die Schlaftheorien usw. berichtet Walz.

III. Verteilung im Körper und Ausscheidung

— Besprechung der Literaturangaben —

Im Folgenden werde ich über die in der Literatur erschienenen Arbeiten berichten, die einerseits die Bromverteilung im Körper, andererseits die Ausscheidungsverhältnisse des Adalins oder des Broms zum Gegenstand haben.

Da Adalin zwar in heißem, jedoch nicht in kaltem Wasser löslich ist, ist es zur Erzielung einer raschen Resorption vorteilhaft, es mit heißer Flüssigkeit einzunehmen (Bayer & Co.). Im sauren Milieu des Magens wird Adalin nicht gelöst, sondern nach Autenrieth erst im alkalischen Saft des Duodenums und Dünndarms. Die Resorptionsverhältnisse sind nicht näher bekannt. Jedenfalls scheint das Adalin durch den Darmsaft nicht chemisch verändert zu werden. In Vergiftungsfällen wurde bei der Sektion im Dünndarm nur unverändertes Adalin gefunden. Ich führte diesbezüglich einige Versuche durch, über die ich später berichten werde (S. 15). Die Resorption scheint nicht vollständig zu erfolgen. Das ist nicht daraus zu schließen, daß bei Vergifteten Adalin noch in größerer Menge im Darm gefunden wurde, was verständlich ist, da die Menge des von Selbstmördern eingenommenen Adalins relativ sehr groß ist und zur Erzielung des tödlichen Ausgangs auch sein muß. Vielmehr ist dies die Meinung von Hoppe und Seegers, die in Versuchen geringe Brommengen im Kot nachwiesen. Sie unterschieden jedoch nicht zwischen organischem und anorganischem Brom; es braucht sich also nicht um unzersetztes Adalin zu handeln.

Wenn auch bisher im Dünndarm nur unverändertes Adalin gefunden wurde, so ist damit natürlich nicht bewiesen, daß es auch unverändert resorbiert wird. Keine der zahlreichen in der Literatur beschriebenen Arbeiten gibt darüber Aufschluß. In den meisten Arbeiten wurde nur Brom nachgewiesen und Schäfer, Impens, Filipi konnten die Identität des von ihnen im Harn gefundenen angeblichen Adalins nicht beweisen.

Die minimale letale Dosis gibt Klimanek mit 23 g Adalin für einen Menschen von 65 kg Gewicht an. Er weist darauf hin, daß auch größere Dosen vertragen werden können.

Balázs beschreibt den Selbstmordfall einer 57-jährigen Frau, die 80 Tabletten Adalin einnahm und dann 30 Stunden später unter den Zeichen von Atemlähmung starb. Die Brombestimmung in den Leichten teilen ergab: im Magen-Darminhalt 264,0 mgr, (das entspricht 781,3 mgr Adalin); in der Leber 38,7 mgr (114,6 mgr Adalin); im Gehirn 15,2 mgr (44,9 mgr Adalin); im Urin (intra vitam) 120,0 mgr (335,0 mgr Adalin). Das gibt zusammen 1,2758 g Adalin, also nur etwa $\frac{1}{30}$ der eingenommenen Menge. Es ist aber zu bedenken, daß sich im übrigen Körper noch größere, nicht bestimmte Mengen befanden.

Zum Vergleich möchte ich die überzeugenderen Untersuchungen von Redonnet anführen, der den Bromnachweis von Wünsche benutzte. Seine Angaben über Neuronal, das dem Adalin chemisch und wirkungsmäßig sehr ähnlich ist, sind genauer als die über Adalin, jedoch entsprechen sie den Verhältnissen bei Adalin. Er spritzte 108 mgr Neuronal, in 0,3 ccm Alkohol und 1 ccm Aqua dest. gelöst, intramuskulär einem Versuchstier ein. Die Untersuchung der Organe ergab: im Darm 13,46 mgr; in der Leber 9,1 mgr; im Gehirn 0,486 mgr; im Blut 14,4 mgr; im übrigen Körper 65,1 mgr. Das sind zusammen 95,3 % der verabreichten Menge. Von diesen beiden Arbeiten sind leider nur Einzelwerte vergleichbar und zwar die jeweils in Gehirn und Leber gefundenen Brommengen. Redonnet gibt an: Leber pro Gramm = 0,21 mgr; Gehirn pro Gramm = 0,16 mgr. Bei Balázs handelt es sich um eine 57-jährige Frau. Nimmt man als durchschnittliches Lebergewicht 1500 g, als durchschnittliches Hirngewicht 1245 g an, so kommt man zu folgenden Zahlen: Leber pro Gramm = ca. 0,076 mgr; Gehirn pro Gramm = ca. 0,037 mgr Adalin. Die Verhältniszahlen der gefundenen Mengen sind somit für die Gewichtseinheit beim Versuchstier Gehirn:Leber = 1:1,3; beim Menschen Gehirn:Leber = 1:2. Das bedeutet eine weitgehende Übereinstimmung bei beiden Autoren, sowie bei Mensch und Tier.

Nach Impens und anderen Autoren ist das Adalin eine sehr labile Verbindung, so daß es im Körper, besonders aber bei alkalischer Reaktion der Leiche rasch abgebaut wird. Wojahn behauptet aufgrund eigener Untersuchungen, daß schon im neutralen bis sauren Milieu innerhalb von 24 Stunden mit einer Abspaltung von HBr zu rechnen ist, bei alkalischem Milieu in noch kürzerer Zeit. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß es sich bei der angeführten Bromverteilung im Organismus nicht nur um Adalin und dessen bromhaltige Spaltprodukte, sondern vor allem um anorganisches Brom handelt. Man nimmt zwar an, daß das Brom große Affinität zur Gehirns substanz besitzt, aber die beschriebenen Verhältnisse zeigen, daß die Leber pro Gewichtseinheit mehr Brom enthält als das Gehirn. Sicher spielt dabei die jeweilige Phase der Vergiftung eine Rolle und der Umstand, daß bei oraler Verabreichung die Leber, wenigstens während der Zeit der Resorption mehr Adalin oder bromhaltige Substanzen enthalten wird. Es ist verständlich, daß bei dem

beschriebenen Vergiftungsfall, wo sich noch im Darminhalt Adalin befand, sich relativ mehr Brom in der Leber findet, als bei dem Tierversuch, wo das Neuronal parenteral verabreicht wurde.

Aufschlußreicher wären natürlich Angaben, bei denen zwischen anorganischem und organischem gebundenen Brom unterschieden wird. Edler führte diese differenzierte Untersuchung beim Nachweis im Harn durch. Aus dem Vergleich von anorganischem und organischem Brom, in den verschiedenen Organen und in verschiedenen Phasen der Vergiftung ließe sich sicher viel Licht in das Stoffwechselverhalten des Adalins bringen. Es scheint, daß die hypnotische Adalinwirkung nicht vom organischen Brom herrührt, sondern nach Takeda, Kwan und Gensler wahrscheinlich vom unzersetzten Adalinmolekül, jedenfalls einer ätherlöslichen, bromhaltigen Verbindung.

Da der hypnotische Effekt durch Einwirkung der entsprechenden Substanz auf das Gehirn bedingt ist, besteht dann die größte Aussicht, die wirksame Substanz, evtl. das Adalin zu finden, wenn man das Gehirn auf diese ätherlösliche, bromhaltige Substanz untersucht, und zwar nicht wie bisher nur mittels Bromnachweis, sondern möglichst durch Reindarstellung und kristalloptischen Nachweis des fraglichen Adalins, am besten in einem so frühen Stadium des durch Adalin erzeugten Schlafes, wo noch mit keinem Abbau des Adalins gerechnet werden muß. Außerdem muß man die sehr rasche Zersetzung des Adalins im alkalischen Milieu des toten Versuchstieres bedenken und sehr rasch nach dem Tode untersuchen.

Erwähnt sei noch die Arbeit von W o j a h n, der nach einer spezifischen Methode suchte, die zugleich eine quantitative Bestimmung des unzersetzten Adalins ermöglicht. Er fand eine Reaktion, die im Prinzip auf der Fällung des Adalins durch Mercuriacetat beruht. Aus dem Niederschlag kann das Adalin mittels Schwefelwasserstoff wieder freigesetzt werden. Die quantitative Bestimmung ist durch Wägung des Niederschlages, sowie durch titrimetrische Bestimmung des im Niederschlag befindlichen Quecksilbers möglich. Die Adalinmenge steht in einer bestimmten Proportion zur Quecksilber- und Niederschlagsmenge. Die Reaktion soll sehr empfindlich sein, so daß Mengen von 0,05 mgr pro 1 cm³ noch einen Niederschlag ergeben. Leider hat W o j a h n nur mit hergestellten Adalinlösungen gearbeitet, so daß die Brauchbarkeit der Methode noch bewiesen werden muß. Theoretische Berechnungen darüber werde ich später bringen. (S. 13)

Wenn auf dem Wege der Organuntersuchung das Stoffwechselverhalten des Adalins nicht geklärt wurde, so scheint die Literatur über die **Ausscheidungsverhältnisse** doch einige Anhaltspunkte zu geben:

Im Urin wird bis heute der Nachweis nur durch die Brombestimmung geführt. Ebenso wurde in wissenschaftlichen Arbeiten meist nur der Bromnachweis gemacht, ohne Unterscheidung von anorganischem und organischem Brom, was einen großen Nachteil gegenüber der Methode bedeutet, die die beiden Bromformen berücksichtigt. Ich will zunächst über die Untersuchungen berichten, in denen versucht wurde, das Adalin nachzuweisen.

Derartige Versuche führten Schäfer, Impens und Filipi durch. Ihre Versuche kann man folgendermaßen zusammenfassen: außer anorganischem Brom wurde eine ätherlösliche, bromhaltige, neutrale Ver-

bindung gefunden, bei der es sich nach Angabe der Autoren um unverändertes Adalin handelte. In weitaus größerer Menge fanden die Untersucher im sauren Ätherextrakt eine bromhaltige Fettsäure, nach Filipi mit einem Schmelzpunkt von 87 bis 88°. Filipi schreibt unter anderem: „Im Harn wird es (Adalin) zum Teil unverändert ausgeschieden. Der größte Teil findet sich als in Äther lösliche, bromhaltige Substanz vom F. 87 bis 88° und der wahrscheinlichen Formel $\text{COOH} - \text{CBr} (\text{C}_2 \text{H}_5)_2$. Nur nach Verabreichung toxischer Dosen wird anorgan. Brom abgespalten.“ Diese Angaben blieben nicht unwidersprochen. So zeigt Rosenmund, daß es sich bei der bei 87 bis 88° schmelzenden Substanz unmöglich um Diaethylbromessigsäure handeln kann, (wie von Filipi angenommen), da diese schon bei 20° schmilzt und nur sehr schwer zur Kristallisation zu bringen ist.

Die drei Autoren arbeiteten im Tierversuch und konnten dabei natürlich toxische Dosen anwenden. Trotzdem fanden sie nur so geringe Mengen der beiden bromhaltigen organischen Substanzen, daß sie diese nicht genau identifizieren konnten. Es ist nicht bewiesen, daß es sich bei der einen Substanz wirklich um unverändertes Adalin handelt. Jedoch kann bei der Übereinstimmung dieser drei Autoren an der Ausscheidung derartiger für Adalin spezifischer Stoffe kaum gezweifelt werden. Daß trotz der verwendeten toxischen Dosen im Tierversuch nur so geringe Mengen gefunden wurden, zeigt die große Schwierigkeit dieser Untersuchungen, besonders beim Menschen, wo nur relativ kleine Adalindosen gegeben werden können. Impens soll die genannten Substanzen jedoch auch im Menschenharn gefunden haben.

In welcher Menge können nun diese organischen Bromverbindungen im Harn erwartet werden? Eine Klärung dieser Frage ist durch getrennte Bestimmung von organischem und anorganischem Brom zum Teil möglich, vorausgesetzt, daß die beiden im Folgenden genannten organischen Stoffe Brom enthalten. Auch das ist nicht bewiesen, aber nach den Untersuchungen, vor allem von Impens sehr wahrscheinlich. Impens war der erste, der beim Bromnachweis zwischen organischem und anorganischem Brom unterschied. Er definierte die Ausscheidungsverhältnisse sehr klar folgendermaßen: Der größte Teil des Adalins wird als Alkalibromid ausgeschieden, während die organischen Adalinstoffwechselprodukte a) eine Halogenfettsäure, b) ein neutraler ätherlöslicher Körper, vielleicht unverändertes Adalin, nur einen ganz geringen Prozentsatz ausmachen. Hierbei wächst das quantitative Verhältnis des organischen zum anorganischen Brom mit der Größe der angewandten Dosis. Während die organische Bromausscheidung schon bald nach der letzten Einnahme des Mittels aufhört, zeigt die anorganische Ausscheidung einen viel protrahierteren Verlauf, ähnlich wie nach Einnahme von Bromalkalien.

Damit ist die Behauptung Filipis, daß nur bei toxischen Dosen anorganisches Brom abgespalten wird, widerlegt. Außerdem wird dadurch die Frage geklärt, die von Hoppe und Seegers aufgeworfen wurde. Die beiden Autoren hatten durch ihre Bromnachweise gefunden, daß nach einmaliger Adalinaufnahme die Bromausscheidung sich sehr protrahiert über mehrere Tage erstreckt. Daraus glaubten sie entnehmen zu können, daß Adalin kumulative Wirkung hat. Dies war in jedem Fall ein falscher Schluß, denn abgesehen davon, daß sie nicht feststellen konnten, daß zwar das anorganische, nicht aber das vielleicht für die hypnotische Wirkung verantwortliche organische Brom protrahiert ausgeschieden wird, haben sie fälschlicherweise nicht bedacht, daß man die

Ausscheidung der Spaltprodukte nicht mit dem Abbau der wirksamen Substanz gleichsetzen darf.

Eine Bestätigung der Arbeiten von Impens gibt Edler, der von seinen Versuchsreihen genaue Zahlen berichtet. Er gibt eine Modifikation der Berglund'schen Methode zum exakten quantitativen Nachweis kleinster Brommengen an. Er bestimmte getrennt das organische und anorganische Brom, indem er erst den Urin drei Stunden lang im Perforator mit Äther extrahierte und dann einerseits im Ätherextrakt das organische, andererseits im extrahierten Urin das anorganische Brom nach der bezeichneten Methode bestimmte. Er nahm im Selbstversuch sieben Tage lang täglich 1 Gramm Adalin ein. Am ersten Tag wurden 25,5 mgr anorganisches Brom ausgeschieden, dann täglich mehr, bis zum Maximum am siebenten Tag mit 172,8 mgr. Danach wurde die Ausscheidung geringer, bis am 35. Tag nichts mehr nachgewiesen werden konnte. Beim organischen Brom fand Edler am ersten Tag 0,6 mgr und am sechsten Tag ein Maximum von 9,7 mgr, schon am 15. Tag nichts mehr. Es gibt also auch für das organische Brom eine gewisse Kumulation. Die insgesamt aufgenommene Brommenge betrug 2,359 g, davon konnte Edler im Urin 89,52 % wiederfinden. Von diesen 89,52 % waren 86,74 % anorganisches und 2,78 % organisches Brom, was einem Verhältnis von 31,2:1 entspricht. Diese Angaben scheinen allerdings etwas zu hoch gegriffen.

Die anorganische Bromausscheidung erfolgte schneller, wenn Edler zugleich mit dem Adalin täglich 8 g NaCl einnahm, schon nach 26 Tagen hörte dann die Ausscheidung auf. Dagegen änderte sich die organische Bromausscheidung nicht.

Das organische Brom macht also einen sehr geringen Prozentsatz aus. Die Angaben zeigen, daß es auch bei einmaliger Adalinaufnahme einige Tage zur Ausscheidung braucht. Meist wird in den Versuchen nach der abendlichen Adalinmedikation nur der konzentrierte Morgenurin auf organische Bromverbindungen untersucht, wobei nur ein Teil der sowieso sehr geringen zu erwartenden Mengen erfaßt werden kann. Die Chancen etwas zu finden sind unter diesen Bedingungen sehr gering, zumal wenn man bedenkt, daß bei der normalen Versuchsmenge beim Menschen von 1 g Adalin nur etwa 1,6 mgr im Tagesurin gefunden werden können, wobei beim Bromnachweis alle organischen bromhaltigen Substanzen gemeinsam quantitativ erfaßt werden können, während bei direktem Kristallnachweis sich diese Mengen in mindestens zwei verschiedene Stoffe aufteilen, die, in ihrer Form noch unbekannt, von den sonst noch vorkommenden Substanzen sicher nicht ohne weiteres zu trennen sind. Wollte man bei einmaliger Adalingabe die Substanzen quantitativ erfassen, so müßte man den gesamten Urin von mindestens 2—3 Tagen untersuchen, wobei die anderen Stoffe in ihrer größeren Menge bei den weniger werdenden Adalinausscheidungsprodukten noch mehr stören. Es bleibt also nur die Möglichkeit, die Ausscheidungsmenge zu vergrößern durch längerdauernde tägliche Adalinverabreichung. Diese Methode führte ich zuletzt durch, nachdem ich vorher nur den Morgenurin nach einmaliger Adalingabe untersucht hatte.

Bei Vergiftungsfällen mit tödlichem Ausgang werden relativ große Adalinmengen eingenommen, nach Berichten von Wojahn, Balázs, Gerhartz und Grigassi zwischen 20 und 50 g. Die Überlebenszeit betrug nach den gleichen Autoren zwischen 12 und 33 Stunden. Für den Fall, daß nach dem Tode eine volle Blase vorgefunden wird, man kann

kaum mit mehr als 300 cm³ rechnen, könnte man bei der durchschnittlichen Überlebenszeit von etwa 24 Stunden große Ausscheidungsmengen erwarten, wenn man das gleiche Verhältnis der Aufnahme zur Ausscheidung annehmen würde, wie es für die kleine Menge von 1 g zutrifft. Das ist aber schon deswegen nicht richtig, weil so große Mengen Adalin nicht so schnell resorbiert werden wie 1 g. Die Resorption erfolgt allmählich bis zum Eintritt des Todes, so daß sich nach dem Tode oft noch erhebliche Mengen im Darminhalt finden. Es kann nur ein Teil des aufgenommenen und auch des resorbierten Adalins durch die Niere ausgeschieden werden, von dem meist wiederum nur der Teil gefunden werden kann, der sich zur Zeit des Todes noch in der Blase befindet. Es wäre daher von Vorteil, wenn möglichst schon während des Comas in verdächtigen Fällen die Blase katheterisiert und der Urin gesammelt würde, um einen Verlust an Harn durch Einnässen zu vermeiden. Aber schon ganz grundsätzlich ist die Annahme falsch, daß das Verhältnis von Aufnahme zur Ausscheidung bei jeder Dosis gleich bleibt. Halberkann und Reiche behaupten aufgrund einer vergleichenden Zusammenstellung der Ausscheidungsverhältnisse mehrerer Barbitursäurederivate, daß die Ausscheidung weder von der Höhe der verabreichten Dosis, noch von der Dauer der Verabreichung, noch von der Menge des abgeschiedenen Urins abhängig sei, sondern jedes Barbitursäurederivat habe seine eigene charakteristische Harnquote. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß das auch für Adalin zutreffen könnte. Sicher wird in Vergiftungsfällen relativ weniger Adalin ausgeschieden, als die bei Einnahme von 1 g gefundenen Werte annehmen lassen. Die Klärung dieser Verhältnisse ist erst möglich, wenn die gesuchten Ausscheidungstoffe bekannt und in ihren physikalischen und chemischen Merkmalen festgelegt sind.

An dieser Stelle möchte ich noch einmal auf die Arbeit von W o j a h n eingehen. Er konnte mit Mercuriacetat, wie schon berichtet, bei einer Verdünnung von 0,05 mgr Adalin auf 1 cm³ wässrige Lösung noch eine Fällung beobachten. Nach den von E d l e r angegebenen Werten ist eine solche Konzentration im Urin nach normaler Dosierung unmöglich, zumal man nach S c h ä f e r, F i l i p i und I m p e n s das organische gebundene Brom nur zu einem kleinen Teil als wahrscheinliches Adalin werten darf. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß mit dieser Methode Adalin im geeigneten Ätherextrakt nachgewiesen oder aus einem Kristallgemisch z. B. des Vakuumsublimates isoliert werden kann.

Verschiedene Identifizierungsreaktionen für Adalin hat G e n o t angegeben.

Eine Eigenschaft des Adalins, die noch berücksichtigt werden muß, ist seine leichte Zersetzbarkeit. I m p e n s hat nachgewiesen, daß sich Adalin mit verdünnten Alkalien sehr schnell zersetzt. Ausführlicher berichten R o s e n m u n d und H e r r m a n n darüber. Danach wird in wässriger Lösung nach einiger Zeit, vor allem bei alkalischer Reaktion und bei Erwärmung HBr, bzw. Alkalibromid abgespalten. In verdünnter alkalischer Lösung löst es sich unter Bildung von NH₃, bei Siedetemperatur entsteht außer HBr noch HCN. Bei längerem Erhitzen mit Wasser, außerdem mit Alkalien und Pyridin entsteht anscheinend Diaethylhydantoin

Es bildet Nadeln aus Benzol und ist leicht löslich in heißem Wasser, Alkohol, Aether, Benzol, Chloroform, wenig in kaltem Wasser.

Diese chemischen Eigenschaften sind für den Adalinnachweis im Urin insofern wichtig, als man aufgrund ihrer Kenntnis möglichst vermeiden

muß, den Urin vor der Bearbeitung längere Zeit stehen zu lassen; wenn es einmal nötig ist, säuert man ihn vorher am besten an. Ebenso kann eine stärkere und längere Erwärmung, z. B. beim Eindampfen auf dem Wasserbad zu chemischen Umwandlungen oder Zersetzung führen. Da alle Methoden der Einengung des Urins ein längeres Stehen oder stärkere Erwärmung notwendig machen, dürfte es am günstigsten sein, den frischgelassenen Urin uneingeengt sofort zu bearbeiten.

In der toxikologischen Praxis herrschen etwas andere Verhältnisse:

Der Urin kommt meist nicht sofort zur Untersuchung, außerdem reagiert er schon in der Blase oft alkalisch, so daß die Aussicht, unzersetztes Adalin zu finden, noch geringer wird. Es ist zu hoffen, daß die sowieso reichlicher zu erwartende Halogenfettsäure (*Impens*) chemisch stabiler ist, so daß ihr Nachweis weniger durch solche äußeren Umstände in Frage gestellt wird.

IV. Untersuchungsergebnisse von Walz

Die jüngste hier bekannte Arbeit über die Adalinalausscheidung stammt von Walz. Neben einer ausführlichen Literaturzusammenstellung über das Adalin und Untersuchungen über das Verhalten des Adalins bei der Papierchromatographie und Spektrophotometrie und der genauen Festlegung der kristalloptischen Merkmale (*Schmidt*), versuchte er mittels Ätherextraktion des mit Weinsäure angesäuerten Urins die für Adalin spezifischen Ausscheidungsprodukte zu erfassen. Zur Trennung der Extrakte verwendete er im wesentlichen die Vakuumsublimation. Dabei fand er bei einer Sublimationstemperatur von 200° konstant zwei Kristallarten in wechselnder Menge. Er glaubte festzustellen, daß diese beiden Kristalle im Adalinharn gegenüber dem Leerharn wesentlich vermehrt auftraten und nahm daher einen Zusammenhang dieser Stoffe mit der Adalinmedikation an. Er charakterisierte diese Kristalle folgendermaßen:

Höher schmelzende Form: F. 204 — 206°, spitze Nadeln, bzw. sehr lang und schmal ausgestreckte Blättchen mit angedeutet keilförmiger Konturierung, d. h. nahezu parallelen Längsseiten. Die Begrenzung der Schmalseiten ist unterschiedlich, aber nahezu 90°. Die Kristalle löschen bei gekreuzten Nikols kaum aus. Optisch zweiaxsig. Im Konoskop erscheint der Austritt einer Achse im Gesichtsfeld meist nicht in der Mitte, sondern mehr am Rande. Die Farbringe umgeben den Achsenaustritt in vielen engen Isochromaten, n_α um 1,58, n_γ liegt zwischen 1,641 und 1,652. In Propylalkohol zeigen sie wenig Löslichkeit.

Niedrig schmelzende Form: F. 116 — 118°. Unregelmäßig geformte, ziemlich dicke, harte, farblose und glasklare durchscheinende Bruchstücke. In den Kristallen liegen achsengerecht Bläschen oder Tröpfchen. Monosymmetrisches Interferenzbild. Achsenaustritt in der Mitte des Gesichtsfeldes. Sehr schwache Doppelbrechung. Optisch zweiaxsig. Brechung in beiden Richtungen zwischen 1,608 und 1,620. Gute Löslichkeit in Propylalkohol.

Adalin selbst oder dessen Spaltprodukte konnte er nicht nachweisen. Der ursprüngliche Zweck der vorliegenden Arbeit war, den Zusammenhang zwischen der Adalinmedikation und den beiden Kristallarten zu prüfen und womöglich die beiden Stoffe zu identifizieren.

C. Eigene Versuche

I. Versuche mit Adalinsubstanz

1. Schmelzpunktbestimmung und Extraktionsversuche aus wässriger Lösung

Der Schmelzpunkt des reinen Adalins wurde mit 113° festgestellt. Bei den von Schäfer, Filipi und Impens durchgeführten Untersuchungen zum Adalinnachweis im Urin wurde der angesäuerte Urin mit Äther extrahiert. Um festzustellen, unter welchen Bedingungen mit der größten Ausbeute zu rechnen sei, löste ich je gleiche Mengen von Adalin in einer bestimmten Menge Wasser und schüttelte je eine Probe der angesäuerten und der alkalischen Lösung mit Äther bzw. Chloroform aus. In sämtlichen Extrakten fand sich ungefähr gleichviel Adalin wieder. Jedoch war bei einmaliger Ausschüttelung in der wässrigen Phase stets noch die etwa gleiche Menge Adalin enthalten wie im Extrakt. Nur durch mehrmalige Ausschüttelung konnte dieses Adalin annähernd quantitativ extrahiert werden.

2. Extraktionsversuch nach Zusatz von Adalin zu biologischem Material

Verdauungsversuche mit Adalin: Adalinsubstanz wurde mit Salzsäure und Pepsin versetzt und für ein bis zwei Tage in den Brutschrank gestellt bei einer Temperatur von 38° . In einem zweiten Versuch wurde zu dem Vorigen Leberbrei gegeben und dieses Gemisch ebenfalls in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde der saure Brei mit Äther extrahiert. Es fand sich unverändertes Adalin, aber kein Anhalt für ein Adalinabbauprodukt.

II. Versuche mit Harnextrakten

1. Vorversuche zur Extraktionstechnik

Um die Versuchsmethode zu finden, die die ergiebigsten Extrakte lieferte, führte ich folgende Vorversuche durch:

Ich teilte 300 ccm Leiharn in sechs Portionen zu je 50 ccm. Zwei der sechs Portionen säuerte ich mit Weinsäure, zwei mit Salzsäure an, zwei machte ich mit NaOH alkalisch. Jeweils einen der zwei gleichbehandelten Urine schüttelte ich mit Chloroform bzw. Äther aus. Das gleiche machte ich mit 300 ccm Harn nach Einnahme von zwei Tabletten Adalin am Abend vorher.

Es zeigte sich, daß der angesäuerte Urin die größte Menge an Extrakt-rückstand ergab und zwar gleichgültig, ob mit Weinsäure oder Salzsäure angesäuert wurde, so daß für die folgenden entsprechenden Versuche nur mit Salzsäure angesäuert wurde. Der saure Chloroformextrakt-rückstand war wesentlich geringfügiger als der Ätherextrakt-rückstand. Sowohl die Äther-, als auch die Chloroformausschüttelung des alkalischen Urins ergab kaum einen Rückstand. Die gleichen Verhältnisse fand ich beim Adalinharn. Leerharn und Adalinharn, die beide ungefähr gleiches spezifisches Gewicht hatten, wiesen keine mengenmäßigen Unterschiede der einzelnen Extrakt-rückstände auf. Jedenfalls konnte von einer größeren Extrakt-rückstandsmenge bei Adalinharn keine Rede sein. Die Extrakt-rückstände bestanden aus einer dickflüssigen, gelbbraunen, durchsichtigen Masse, allerdings in so kleiner Menge, daß ich eine Vakuum-sublimation nicht durchführen konnte. Standen die Extrakte längere Zeit im Kalten, so fielen, vor allem deutlich im sauren Ätherextrakt einzelne lange, nadelförmige Kristalle aus. Sie entsprachen den Kristallen der von Walz beschriebenen hochschmelzenden Fraktion, wie die später darzustellende Mikrosublimation und kristalloptische Untersuchung zeigte.

Um eine möglichst quantitative Anreicherung der zu extrahierenden Stoffe im Extraktionsmittel zu erreichen, wurde der Urin in den folgenden Versuchen eingeeengt.

2. Gewinnung der trockenen Extrakt-rückstände

Nach der nun zu beschreibenden Methode untersuchte ich 15 Leerharne und 15 Adalinharne. Der frisch gelassene Morgenurin wurde gemessen, sein spezifisches Gewicht bestimmt und anschließend in einer Porzellanschüssel auf dem Wasserbad bei 80 bis 90° verdampft. Der Urin wurde nicht völlig eingetrocknet, sondern nur zu einem dünnen Sirup eingeeengt, der dann mit etwas Aqua dest. ausgespült und in einen großen, etwa 1 Liter fassenden Scheidetrichter gefüllt wurde. Dieser dünnflüssige Sirup wurde mit HCl angesäuert, bis er leicht sauer reagierte. Dann wurde mit Äther 5 Minuten lang ausgeschüttelt. Ich wählte die jeweils gleiche Menge Äther. Es handelte sich meist um 300 bis 500 cm³. Darauf folgte eine zweite Ausschüttelung. Bei der Ausschüttelung bildete sich im Äther eine geleeartige, gelbliche Masse, die sich im Laufe von ein bis zwei Tagen zum größten Teil verflüssigte. Nach einem Tag wurde der Urin abgelassen. Im Laufe des folgenden Tages setzte sich immer noch etwas Urin ab, der laufend abgelassen wurde. Zwei Tage nach der Ausschüttelung wurde der Äther filtriert, wobei die letzten Reste der geleeartigen Masse abgetrennt wurden. Das Ätherfiltrat wurde mit frisch geglühtem Na₂SO₄ versetzt, 3 Minuten geschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen. Auf diese Weise versuchte ich den Äther vollständig wasserfrei zu bekommen und damit auch von evtl. störenden wasserlöslichen Substanzen zu befreien. Um das Abdampfen so schonend als möglich zu gestalten, benutzte ich dazu den Föhn. Es zeigte sich aber, daß sich dabei Luftfeuchtigkeit kondensierte, so daß sich nach dem Verdunsten des Äthers mehrere cm³ Wasser angesammelt hatten. Ich ging daher davon ab und dampfte den Äther auf einem nur schwach erwärmten Wasserbad ab, wobei darauf zu achten war, daß sich die Ätherdämpfe nicht entzündeten.

Die Extrakt-rückstände unterschieden sich in Menge und Aussehen. Meist fand sich eine zähflüssige, braune Masse von aromatischem Geruch;

in wenigen Fällen hellbraune, offensichtlich kristallhaltige Häufchen in oft weitaus größerer Menge. In allen Fällen kristallisierten nach mehrstündigem Stehen im Kalten an der Wand der Abdampfschale farblose, lange, dünne Kristallstengel aus. Die Extraktrückstände wurden zur Trocknung für ein bis zwei Tage in den Exsiccator gestellt. Ich versuchte quantitative Unterschiede zwischen Leer- und Adalinharnextrakten zu finden und wog daher die Extraktrückstände nach der Trocknung. Meine Ergebnisse waren folgende: insgesamt, unter Berücksichtigung der verwendeten Urinmenge und des spezifischen Gewichtes ergaben die Adalinharne nicht mehr Extraktückstand als die Leerharne. In 14 von 20 untersuchten Harnen betrug das Gewicht der Extraktückstände zwischen 0,5 und 0,2 g. Diese Extrakte bestanden aus der beschriebenen braunen Masse ohne die kristallartigen Häufchen. Mehr Extrakt, bestehend aus den hellbraunen, teils weißlich schimmernden Häufchen, fand sich dreimal in Adalinharnextrakten, und zwar einmal 0,3 g und zweimal 0,5 g; aber ebenso dreimal in Leerharnextrakten, davon einmal 0,45 g und zweimal 0,35 g. Die Ergebnisse waren vollkommen uneinheitlich: so ergaben sich z. B. bei einer Versuchsperson aus je zwei Leer- und Adalinharnen immer gleiche Extraktmengen. Bei einer weiteren Versuchsperson fand sich nur 0,1 g Adalinharnextraktückstand, während sich in dem Leerharn von etwa gleicher Menge und gleichem spezifischen Gewicht 0,35 g ergaben, die aus den hellbraunen Kristallhäufchen bestanden. Auffällig war, daß diese letztere Versuchsperson am Tage bevor der Leerharn gesammelt wurde, sehr viel Obst und Gemüse gegessen hatte. Diesen Umstand konnte ich noch in einem weiteren Fall beobachten, wobei allerdings am Abend vorher auch ein Gramm Adalin eingenommen worden war. Dies wies darauf hin, daß vielleicht Nahrungs- und Genußmittel einen Einfluß auf die Ausscheidung dieser betreffenden noch näher zu untersuchenden Kristallart haben. Da die braune Schmiere des Extraktückstandes für die Reingewinnung der Kristalle sich als äußerst störend erwies, versuchte ich bei einigen weiteren Urinen andere Lösungsmittel zu verwenden. Dabei fand ich, daß bei der Ausschüttelung mit Chloroform der Extrakt zwar gering war, aber aus einer dunkelbraunen, fast festen Masse bestand, die makroskopisch und mikroskopisch keine Kristalle zu enthalten schien. Wenn ich diese Urine dann nachträglich noch mit Äther ausschüttelte, waren die Extraktückstände zwar etwas geringer als bei alleiniger Ätherausschüttelung, bestanden aber dafür aus hellbraun bis gelb gefärbten Kristallhäufchen. Ich hatte damit schon bei der Extraktion eine wesentliche Trennung der Kristalle von der braunen Schmiere erreicht, die auch Walz bei der Trennung der Extraktückstände als sehr störend empfunden hatte.

Für die Reindarstellung der Kristalle erwies sich diese vorherige Chloroformextraktion als sehr brauchbar. Andererseits zeigte sich bei der späteren Vakuumsublimation des Chloroformextraktückstandes, daß dieser immer noch Kristalle enthielt, und zwar von der gleichen Art wie die im Ätherextraktückstand enthaltenen. Es war also vorteilhaft gewesen, für die Beurteilung der Extraktückstandsmengen die alleinige Ätherextraktion zu verwenden.

3. Sublimation der Extraktückstände

Bei der Verarbeitung der Extrakte handelte es sich einmal darum, die Kristalle von der braunen Schmiere zu trennen und weiterhin die Kristalle isoliert darzustellen. Zu dem Zweck wandte ich nach Walz die

Vakuumsublimation an: Die zu sublimierende Substanz wurde in ein Reagensglas gebracht und dieses über eine, vor Wasserrückfluß schützende Glasflasche, ein Quecksilbermanometer und ein Rückschlagventil an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Erwärmt wurde das Reagensglas durch Eintauchen in ein erhitztes Paraffinbad. Später benützte ich einen Aluminiumblock, der besonders zu diesem Zweck angefertigt wurde. Er enthält eine entsprechend weite und etwa 3 cm tiefe Bohrung für das Reagensglas und daneben eine Bohrung für das Thermometer. Die Vorteile dieses Aluminiumblockes sind die schnellere Erwärmbbarkeit und Abkühlung und die größere Sauberkeit bei der Arbeit. Um die Temperatur genau feststellen zu können, prüfte ich die Schmelzpunkte einiger bekannter Stoffe, z. B. Coffein und fand, daß das Thermometer ziemlich genau die auf dem Boden des Reagensglases herrschende Temperatur anzeigt.

Ein Nachteil der Methode ist, daß an der Stelle, wo das Glas den Aluminiumblock verläßt, ein starker Temperaturabfall erfolgt. Es fehlt daher in diesem Bereich das kontinuierliche Temperaturgefälle, das für eine Trennung der Sublimate notwendig ist.

Zuerst sublimierte ich die aus brauner Schmiere bestehenden Extrakte. Die Schmiere fing bei 40° an zu siedeln und hochzuspritzen, auch bei stundenlanger Sublimation und bis zu Temperaturen von 200°, ohne daß irgendwelche Sublimate auftraten. Die braune Schmiere färbte sich dabei allmählich schwarz und wurde nach mehreren Stunden zähflüssig. Beim Abkühlen erstarrte sie zu einer sehr harten, glasartigen, schwarzen Masse. Erst wenn diese, zu feinem Pulver zerstoßen in einem frischen Reagenzglas erneut sublimiert wurde, traten zwischen 150 und 200° spärlich Kristalle auf, die meist noch durch braune Farbstoffe verunreinigt waren. Diese Kristalle waren nicht sicher zu verwerten, schon deshalb, weil der Extrakt vor der eigentlichen Sublimation stundenlang auf hohe Temperaturen erhitzt werden mußte. Die Gefahr, daß es dabei zu chemischen Veränderungen kam, war zu groß. Wahrscheinlich gaben diese schmierigen Extrakte auch bei tagelangem Verweilen im Exsiccator ihr Wasser nicht ganz ab, und nach den Erfahrungen, die ich auch bei späteren Versuchen machte, kam es zu keiner reinen Sublimation von Kristallen, solange der zu sublimierende Stoff noch Wasser enthielt. Vielmehr bildeten sich dann in verschiedenen Höhen des Reagenzglases Flüssigkeitsbeschläge, die meist nicht auskristallisierten.

Ich verwendete daher für die Sublimation weiterhin die aus den hellbraunen, körnigen Kristallhäufchen bestehenden Extrakte. Meist waren diese so reichlich, daß ich sie ohne merklichen Substanzverlust mit Filterpapier trocknen konnte. Sie färbten sich bei dieser Trocknung fast weiß; es wurden dadurch also auch die störenden Farbstoffe entfernt. Aus diesen Extrakten erhielt ich sehr reine Sublimate. Bei einer Temperatur von 100 bis 140° sublimierten im Zeitraum von einigen Stunden zwar manchmal wenige Kristalle, sie waren aber nach dem Aussehen und dem Schmelzpunkt nicht mit den von Walz beschriebenen identisch. Da meine Aufgabe vorerst darin bestand, die von Walz mit Adalin in Beziehung gebrachten Kristalle zu identifizieren, ließ ich sie vorläufig unbeachtet. Ich werde mich später mit ihnen befassen.

Ich ging mit der Temperatur stufenweise höher, um nicht durch zu starke Erhitzung Kunstprodukte zu schaffen. Bei 150 bis 160° erhielt ich dann tatsächlich eine Kristallform, die der unteren, also höher schmelzenden Form von Walz entsprach. Es waren strahlige, lange, schmale, oft gebogene Nadeln im unteren Drittel des Reagenzglases, die in Aussehen

und kristalloptischem Verhalten mit der unteren Fraktion von Walz identisch waren. Da ich aber nicht wie Walz auch eine höhere Fraktion fand, Walz jedoch bei 200° sublimierte, erhöhte ich die Temperatur auf 200° , wobei nun im oberen Drittel des Glases diese höhere, niedriger schmelzende Kristallform auftrat. Diese Sublimate hatten im Reagensglas teils ein flächenhaft gitterförmiges, teils auch ein sternchenartiges Aussehen. Manchmal waren in ganz geringer Menge auch anders gestaltete Kristalle im jeweiligen Teil des Glases. Daß es sich dabei um andere Substanzen handelte, zeigte die in diesen Fällen immer deutliche Schmelzpunktniedrigung.

4. Untersuchung der Vakuums sublimate

a) Hippursäure:

Zunächst untersuchte ich die untere, höher schmelzende Sublimatform und führte zuerst die **Mikrosublimation** auf dem Heitzisch nach Kofler durch: bei 140° traten am oberen Objektträger die ersten Tröpfchen auf. Je nach der Geschwindigkeit der Erhitzung wuchsen allmählich lange, dünne Nadeln ein, infolge der nur annähernd parallelen Kanten in einer feinen Spitze auslaufend. Zuweilen waren die Nadeln leicht gebogen. Bei der Schmelzpunktbestimmung färbten sich die Kristalle ab 160° zunehmend dunkler. Bei 182° schmolzen sie unter Bildung von beweglichen Schmelztropfen. Diese färbten sich bei weiterer Erwärmung über 200° erst gelb, dann braun und schließlich dunkelbraun. Manchmal ließ sich über 200° auch eine Rotfärbung feststellen.

Beim Abkühlen kristallisierten die Schmelztropfen nicht aus. Die Form der Kristalle stimmte genau mit den höher schmelzenden Kristallen von Walz überein, wie aus dessen Beschreibungen und Photographien ersichtlich ist. Dagegen stimmte nicht der Schmelzpunkt, der bei meinen Kristallen bei vielmaliger Nachprüfung ziemlich genau immer 182° betrug, während Walz 204 bis 206° angab. Die genaue Identifizierung war daher nur durch die polarisationsmikroskopische Untersuchung (Schmidt) möglich: die Werte stimmten genau mit den schon oben bei Walz gemachten Angaben überein.

Nach Ermittlung aller wesentlichen Merkmale der Substanz ergab sich die Aufgabe, sie zu identifizieren. Eiweißartige und schwefelhaltige Stoffe wurden durch die Millon- und Ninhhydrinreaktion auf Eiweiß und durch die Grote-Reaktion auf Schwefel ausgeschlossen. Die Reaktion war sauer.

Wir gingen nun empirisch vor und verglichen die Säure mit den im Harn üblicherweise vorkommenden Kristallen von Säurecharakter, wobei wir besonders auf den Schmelzpunkt und die kristalloptischen Merkmale achteten. Es zeigte sich, daß die **Hippursäure** bei der polarisationsmikroskopischen Untersuchung (Schmidt) unseren Kristallen von der höher schmelzenden Form genau gleich. Auch bei der Mikrosublimation verhielt sie sich gleich. Ihr Schmelzpunkt lag zwar um einiges höher, nach Kofler bei 190° , nach eigenen Untersuchungen auf dem Kofler'schen Heitzisch bei 189° , während unsere Kristalle bei 182° schmolzen. Die Differenz der Schmelzpunkte kann auf Verunreinigung oder Wasseraufnahme zurückgeführt werden, da bekanntlich die Isolierung von kristallisierten Substanzen aus biologischem Material bis zur völligen Schmelzpunktreinheit sehr schwierig ist.

Entscheidend für die Identität zweier Stoffe ist die Bestimmung des Mischschmelzpunktes. Bei Vorliegen von zwei verschiedenen Stoffen müßte es zu einer merklichen Senkung des Schmelzpunktes kommen, und zwar unter den Schmelzpunkt der niedriger schmelzenden Form. Der von uns ermittelte Mischschmelzpunkt war nicht ganz konstant, aber er lag immer zwischen 182 und 188°. Der Mischschmelzpunkt sprach also für die Identität und da das Kristalloptische Verhalten in beiden Fällen genau das gleiche war, kann an der Gleichheit der beiden Stoffe kaum gezweifelt werden. Somit handelt es sich bei der höher schmelzenden Form, des bei 200° vakuumsublimierten Ätherextraktückstandes um **Hippursäure**: $(C_6H_5) - CO - NH - CH_2 - COOH$.

b) Benzoessäure:

Ich möchte vorausschicken, daß ich bei der Mikrosublimation der niedrig schmelzenden Kristallfraktion manchmal Sublimate erhielt, die weder der Form nach der oberen Fraktion von Walz glichen, noch einen Schmelzpunkt von 116 bis 118°, sondern einen viel niedrigeren, oft unter 100° aufwiesen. Der Schmelzvorgang erstreckte sich über 10 bis 20°, weshalb ich annahm, daß es sich um Kristallgemische handelte. Aber in der größeren Zahl der Fälle fanden sich doch die im Folgenden beschriebenen Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 114 bis 118°.

Bei der Mikrosublimation traten die ersten Kristalle bei etwa 60° auf, und zwar in der Form von unregelmäßigen, vieleckigen, wahllos durcheinanderliegenden Platten und Blättchen. Erst ab etwa 100° formte sich das Sublimat zu den typischen Kristallen um: farblose, durchsichtige Blättchen mit Parallelstruktur, teils länger, bandförmig, teils rautenförmig, vereinzelt auch sechseckig. In die Kristalle waren häufig Flüssigkeitsbläschen eingelagert.

Diese Formen wurden umso typischer, je mehr sich die Temperatur dem Schmelzpunkt näherte. Die Kristalle schmolzen bei 114 bis 118° unter Bildung großer Schmelztropfen. Schon bei geringer Temperatursenkung kristallisierten die Tropfen sphaeritisch aus. Auch hier stimmte die Kristallform mit der von Walz gefundenen genau überein. Für den Schmelzpunkt war die Spanne etwas größer, nämlich 114 bis 118°, gegenüber Walz mit 116 bis 118°. Dies mag daran liegen, daß die Feststellung des Schmelzbeginns weitgehend subjektiv erfolgt, so daß sich bei verschiedenen Untersuchungen bei ein und derselben Substanz oft etwas abweichende Werte ergeben. Den Beweis, daß es sich wirklich um die gleiche Substanz handelte, erbrachte die Untersuchung der kristalloptischen Merkmale mit dem Polarisationsmikroskop (Schmidt). Auch hier war eine volle Übereinstimmung vorhanden.

Die **Identifizierung** der Substanz war hier wesentlich einfacher als bei der Hippursäure. Bei der Vakuumsublimation war mir aufgefallen, daß diese Kristallfraktion erst bei Temperaturen über 200° auftrat, obwohl sie bei ihrem Schmelzpunkt von 114 bis 118° schon vor der Hippursäure sublimieren müßte, was sie ja bei der Mikrosublimation auch tat. Es mußte eine Substanz sein, die erst bei hoher Temperatur, wahrscheinlich durch Zersetzung eines anderen Stoffes entstand.

Ich nahm aus Urinextrakten gewonnene Hippursäure und sublimierte sie im Vakuum. Bei Temperaturen von 200° aufwärts fanden sich dann schon nach kurzer Zeit die niedrig schmelzenden Kristalle in reiner

Form, wie die Prüfung aller angegebenen Merkmale ergab. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der chemisch reinen Hippursäure.

Es mußte sich um ein Zersetzungsprodukt der Hippursäure handeln. Entsprechend der chemischen Formel und nach Literaturangaben über Hippursäure (Limpricht und Uslar) kam in erster Linie die Benzoessäure in Betracht. Der Schmelzpunkt von $122,5^{\circ}$ nach Kofler konnte damit in Einklang gebracht werden, wenn man die unvermeidlichen geringen Verunreinigungen der Extrakte berücksichtigte.

Nun wurden die üblichen Vergleiche durchgeführt: Sublimation, Schmelzpunktbestimmung, Polarisationsmikroskopie (Schmidt). Es war die gleiche Substanz. Den Beweis lieferte auch hier der Mischschmelzpunkt. Reine Benzoessäure schmolz nach eigenen Untersuchungen auf dem Kofler'schen Heiztisch bei 121° . Der Mischschmelzpunkt betrug 114 bis 118. Es lag also keine Schmelzpunktdepression vor, und somit handelte es sich also bei unserer Substanz um **Benzoessäure**: $(C_6H_5) - COOH$.

5. Besprechung der Literaturangaben über Hippursäure und Benzoessäure im Harn

Die Hippursäure wurde zuerst von Liebig aus dem Harn von Pflanzenfressern isoliert. Die Verhältnisse beim Menschen wurden u. a. von Weismann, Wichowski, Liebig untersucht. Normalerweise scheidet der Mensch täglich etwa 1 g Hippursäure aus. Eine vermehrte Ausscheidung erfolgt bei gesteigerter Aufnahme von pflanzenreicher und nukleinreicher Kost. Außerdem bei Einverleibung von Benzoessäure oder Stoffen, die im Körper Benzoessäure abspalten wie Toluol, Äthylbenzol, Hydrozimtsäure, Zimtsäure, Phenylvaleriansäure, Oxyphenylpropionsäure, Chinasäure und Benzoylessigsäure. Dazu kommen neuere Untersuchungen in der Schweiz (Haberland, Bruns und Altmann), die besagen, daß auch Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure und Phenylserin eine Vermehrung der Hippursäureausscheidung bedingen, wahrscheinlich über Benzaldehyd und durch dessen Oxydation zur Benzoessäure.

Hallmann erwähnt die vermehrte Ausscheidung bei Aufnahme von Salicylpräparaten und bei Leberkrankheiten.

Aus diesen Angaben ergibt sich kein Anhalt dafür, daß Adalin (Diaethylbromacetylcarbamid) eine vermehrte Hippursäureausscheidung bewirken sollte. Nach Salkowski entsteht die für Bildung von Hippursäure erforderliche Benzoessäure bei Pflanzen- und Fleischfressern zum Teil im Darm bei der Verdauung der Nahrung, zum Teil in den Geweben und Organen durch Spaltung von Eiweiß. Nach Baumann ist die Ausscheidung der Hippursäure ausschließlich von den Fäulnisprozessen im Darm abhängig. Nach Versuchen von Bunge, Schmiedeberg und Kochs wird die Hippursäure erst in der Niere aus Benzoessäure und Aminoessigsäure gebildet.

Ein Zusammenhang zwischen Hippursäureausscheidung und der Adalinmedikation ist also ziemlich unwahrscheinlich. Dies ergaben auch meine Versuche, bei denen etwaige Zufallsbefunde durch die relativ große Zahl von dreißig untersuchten Urinen ausgeschlossen waren.

Meine Versuche deuten auch darauf hin, daß eine gewisse Abhängigkeit der ausgeschiedenen Hippursäuremenge von der Nahrung besteht. Diese Verhältnisse weiter nachzuprüfen lag nicht im Sinne dieser Arbeit.

Weniger umfangreich sind die Literaturangaben über Benzoessäure. Limpricht und Uslar schreiben darüber, daß Hippursäure, auf 240° erhitzt in Benzoessäure, Benzonitril, Blausäure und andere Produkte zerfällt. Die Benzoessäure des Urins stammt im wesentlichen aus der Hippursäure, soll aber auch unabhängig davon im Harn vorkommen. Ich konnte sie bei meinen Versuchen außer bei Erhitzung der Hippursäure nicht finden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß sie in Mengen, die mit meiner Methode nicht nachweisbar sind, auftreten kann. Die Benzoessäure schien für meine Arbeit insofern von Bedeutung, als sie den gleichen Schmelzpunkt wie Adalin hat. Bei der Vakuumsublimation mußte ich beide nahe beisammen oder sogar als Mischkristalle erwarten. Es konnte sowohl Adalin als Verunreinigung von Benzoessäure, als auch umgekehrt Benzoessäure als Verunreinigung von Adalin auftreten. In den folgenden Versuchen habe ich diese Möglichkeit berücksichtigt und ausgeschaltet: da das Adalin bei 113° und das zu erwartende Abbauprodukt bei etwa 90° schmilzt, muß eine Sublimationstemperatur von 120° vollauf genügen, um eine möglichst quantitative Sublimation zu erreichen. Bei dieser Temperatur sublimiert aber weder Hippursäure, noch die aus der Hippursäure stammende Benzoessäure.

Im Übrigen ging ich weiterhin so vor, daß ich die aus Leerharn und Adalinharn gefundenen Kristallarten miteinander verglich.

III. Versuche zum Nachweis von spezifischen Adalinausscheidungsprodukten im Urin

1. Äther- und Chloroformausschüttelung des durch Gefrieren eingeeengten Urins

In den bisherigen Versuchen engte ich den Urin ein, um eine stärkere Anreicherung der gesuchten Stoffe im Extraktionsmittel zu erzielen. Dazu dampfte ich den Urin auf dem Wasserbad ab, was die Gefahr mit sich brachte, daß dadurch manche Substanzen sich verflüchtigten und zersetzten. Um den Urin zu konzentrieren, ohne dieses Risiko einzugehen, engte ich ihn in der folgenden Versuchsreihe durch Gefrieren ein. Auf diese Weise behandelte ich vier Leer- und vier Adalinharne. Der Harn wurde nach Einnahme von zwei Tabletten Adalin am Abend vorher wie sonst gemessen, sein spezifisches Gewicht bestimmt und anschließend in einem Metallgefäß in eine Kältemischung gestellt. Am nächsten Tag war der Harn etwa zur Hälfte gefroren, der nicht gefrorene Teil war ungefähr auf das Doppelte eingeeengt und hatte meist ein spezifisches Gewicht um 1040. Dieser eingeengte Urin wurde, wie im vorigen Kapitel beschrieben, weiter behandelt mit HCL-Ansäuerung, Chloroform- und Ätherextraktion, Abdampfen auf dem Wasserbad, Vakuumsublimation und anschließender Bestimmung der gefundenen Kristalle durch die Mikrosublimation. Ich brauche dieses Verfahren nicht weiter zu beschrei-

ben und werde gleich die Ergebnisse berichten: Konstant fand ich bei Sublimationstemperaturen von mindestens 140° Hippursäure und die daraus entstehende Benzoesäure. Beide Stoffe waren manchmal durch andere Substanzen verunreinigt, ohne daß diese genau zu bestimmen waren.

a) Isolierung von Harnstoff:

Versuchsweise untersuchte ich auch das vom eingeeengten Urin abgetrennte blaß-gelblich gefärbte Eis. Ich schmolz es und behandelte es wie üblich weiter. Bei der Sublimation fand sich weder Hippursäure noch Benzoesäure. Als ich jedoch bei Temperaturen zwischen 100 und 140° sublimierte, bildeten sich im Reagenzglas ausgedehnte Flüssigkeitsbeschläge, wie auch schon bei früheren Versuchen, wo es selten zur Auskristallisation gekommen war. Hier aber trat nach einigen Stunden an Stelle der Flüssigkeitsbeschläge über die unteren zwei Drittel des Reagenzglases ein dichter Kristallbelag auf. Bei mikroskopischer Betrachtung bestanden sie aus mindestens zwei, sich größtenteils überlagernden Kristallarten, die weder der Hippursäure noch der Bronzesäure glichen. Vorherrschend war ein dichtes Geflecht ohne erkennbare Einzelkristalle, teilweise strahlig radiär, ähnlich der sphaeritisch auskristallisierten Schmelze verschiedener Kristalle. In den Lücken des Geflechtes lagen teils quadratische, teils rechteckige Blättchen, die in etwas Flüssigkeit eingebettet waren. Ich versuchte die geflechtartigen Kristalle zu mikrosublimieren. Dies ging wider Erwarten gut, obwohl ich stets größere Mengen der kleinen Blättchen mit auf den Objektträger brachte. Es zeigte sich, daß die Blättchen im Verhältnis zu den anderen Kristallen nur sehr langsam sublimierten, so daß nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung der Sublimation keine Blättchen mehr vorhanden waren. Trotzdem war die Kristallform uneinheitlich. Der Sublimationsverlauf war folgendermaßen: bei 70 bis 80° traten kleine Tröpfchen auf, die mit steigender Temperatur größer wurden. Allmählich wuchsen Nadeln ein, die teils in die Länge wachsend zu einer baumartigen Verzweigung führten, teilweise auch sich verbreiternd Verbindungspfeiler zwischen den einzelnen Ästen darstellten. In anderen Fällen tauchten bei 70 bis 80° kleine plumpe Stäbchen auf, die teils isoliert blieben, teils ebenfalls Verästelungen bildeten. In den meisten Fällen beschlug sich bei etwa 100° schlagartig das ganze Gesichtsfeld mit einem dichten, nur an einzelnen Stellen lückenhaften Belag, der aus sehr kleinen Stäbchen zu bestehen schien. Am Rande ragten meist dünne Spieße heraus.

Dies sind nur die häufigsten aus der Vielfalt der möglichen Formen. Daß es sich trotzdem um die gleiche Substanz handelte, zeigte der immer gleichbleibende Schmelzpunkt von 128 bis 130°. Die Substanz hatte, gegenüber anderen Kristallarten, einen auffälligen Harngeruch.

Der Schmelzpunkt von Harnstoff beträgt nach Kofler 135° und konnte somit mit meinen Werten übereinstimmen. Reiner Harnstoff verhält sich bei der Sublimation ähnlich, ebenso stimmten die kristalloptischen Daten überein (Schmidt). Den Beweis der Identität lieferte die Bestimmung des Mischschmelzpunktes und die papierchromatographische Untersuchung, die ich zur Kontrolle durchführte, so daß kein Zweifel besteht, daß es sich um **Harnstoff** handelte.

b) Isolierung einer weiteren Substanz,
wahrscheinlich Harnsäure:

Die oben beschriebenen kleinen Blättchen konnte ich isoliert aus den Harnstoffgeflechten entnehmen und isoliert mikrosublimieren. Ab 80 bis 90 ° bildeten sich kleine Körnchen, die sich sehr langsam vergrößerten. Erst nach mindestens $\frac{1}{2}$ -ständiger Sublimation, nicht über 140 °, formten sich deutliche quadratische oder rechteckige Blättchen heraus. Von Anfang an waren sie stets in Flüssigkeit eingelagert. Ich konnte sie niemals in trockenem Zustand erhalten. Über 140 ° wurden sie langsam kleiner und undeutlicher. Sie schienen sich in der Flüssigkeit ohne erkennbares Schmelzen zu lösen, so daß der Schmelzpunkt nicht bestimmbar war. Er scheint über 140 ° zu liegen. Infolge der geschilderten Eigenart der Kristalle war die genaue kristalloptische Bestimmung erschwert. Aber sie sind in ihrer Form so einfach und allein durch die geschilderten Eigenschaften gut charakterisiert, daß sie jederzeit leicht zu erkennen sind. Es seien noch folgende Merkmale angegeben: Teils rechteckige, teils quadratische Blättchen, z. T. in der Lösung abgerundet. Sehr geringe Doppelbrechung, praktisch isotrop. Nach nachträglicher Mitteilung von Schmidt handelt es sich hierbei mit größter Wahrscheinlichkeit um eine Sublimationsform der Harnsäure.

Dieses Sublimat stammte aus einem Leerharn. Da mein Ziel war, Stoffe zu finden, die nur im Adalinharn vorkommen und bei denen die Wahrscheinlichkeit besteht, daß sie Adalinausscheidungsprodukte darstellen, bestimmte ich diese auch im Leerharn vorkommenden Kristalle nicht näher. Ich versuchte, die beiden letztgenannten Stoffe auch in den anderen Sublimaten zu finden. Nur in einigen Fällen konnte ich kleine Mengen davon nachweisen, sozusagen als Verunreinigungen. Merkwürdig ist, daß sie vor allem im Eis, also dem wässrigen Teil des durch Gefrieren eingeeengten Urins zu finden waren.

c) Isolierung einer unbekannten Substanz:

In einem sauren Chloroformextrakt trat eine neue, bisher nicht beobachtete Kristallart auf. Bei der Vakuumsublimation fand sie sich im oberen Drittel des Reagenzglases in Form von halbkreis- bis kreisförmigen Blättchen, oft verzwilligt oder verdreht, wobei die Einzelkristalle jeweils räumlich senkrecht aufeinander lagen, so daß sie ein sternchenartiges Bild ergaben. In manchen Fällen bildeten sie amorphe Häufchen, die erst bei der Mikrosublimation die charakteristischen Formen zeigten. Das Auffällige an den Kristallen war, daß sie bei lang dauernder Vakuumsublimation, besonders bei höheren Temperaturen, wieder verschwanden, ebenso wenn das Reagenzglas einen Tag lang aufbewahrt wurde.

Bei der Mikrosublimation sublimierten sie schon ab 25 °, bei etwa 50 ° wurden sie undeutlich und wieder kleiner, bis nichts mehr vorhanden war. Bei 25 ° traten zuerst Stäbchen auf, die sich zu in den Raum hineinragenden Fünfecken, Trapezen, Dreiecken und Halbkreisen auswuchsen. Es entstanden dabei wenige große Kristalle. Wurde bei 30 bis 40 ° mit der Sublimation begonnen, so bildete sich ein dichter Belag aus mit vielen kleinen, in ihrer charakteristischen Form kaum erkennbaren Kristallen. Der Schmelzpunkt war nicht genau feststellbar, da die Sublimat spätestens bei 60 bis 70 ° wegsublimiert waren. Er dürfte ungefähr

zwischen 90 und 110° liegen, wie ich durch Auflegen der Gläser bei verschiedener Temperatur feststellen konnte. Um die kristalloptischen Merkmale (Schmidt) zu bestimmen, mußte das frisch hergestellte Mikrosublimat mit einem Tropfen Transparenzöl bedeckt werden. Erst dann hielten sich die Kristalle über längere Zeit. Folgende Merkmale wurden festgestellt: Die Kristalle liegen nicht in der Ebene des Glases, sondern stehen steil auf dem Glas. Sie bilden unregelmäßige Dreiecke mit abgeschnittenen Spitzen. Starke Doppelbrechung, quer zur Längsrichtung. Polarisationsfarben I. Ordnung. Vielfach verzwilligt. Zentrosymmetrisch. Optisch positiver einachsiger Kristall. Achsenaustritt im Gesichtsfeld am Rande.

Auch diese Kristallform konnte ich in einem Teil der mit Chloroform oder Äther ausgeschüttelten Leer- und Adalinharnen in wechselnder Menge feststellen. Wahrscheinlich sind sie immer vorhanden, aber wegen der schnellen Sublimation werden sie bei höherer Sublimationstemperatur nicht erfaßt, und wenn sich nur kleinere Mengen im Reagenzglas befinden, verschwinden sie nach wenigen Stunden. Es ist anzunehmen, daß sie auch beim Einengen des Urins durch Erwärmen auf dem Wasserbad sich verflüchtigen.

Außer den genannten Stoffen fand ich bei dieser Methode keine Kristalle, die für Adalin spezifisch hätten sein können.

Ich muß noch bemerken, daß die bisher genannten fünf Stoffe infolge der noch verbesserungsbedürftigen Methode bei der Vakuumsublimation sich öfter überlagerten, wobei dann uncharakteristische Kristallformen vorlagen, die jedoch wegen der niedrigen, weit auseinandergezogenen Schmelzbereiche als Mischkristalle zu erkennen waren.

2. Extraktion des durch Eintrocknung im Luftstrom eingegangenen Urins im Perforator

Auf einer emaillierten Wanne wurde der Urin mit dem Föhn bis zur Trocknung eingengt, der trockene Rückstand zusammengekratz und im Perforator zwei bis drei Stunden nacheinander mit Chloroform, Äther und Alkohol extrahiert, dann wie üblich das Extraktionsmittel abgedampft, der Rückstand getrocknet und sublimiert. Die Zahl der untersuchten Urine betrug sechs: drei Leer- und drei Adalinharnen. In den Extrakten fanden sich bei entsprechender Sublimationstemperatur alle bisher genannten Kristallformen, und zwar regelmäßig und reichlicher als bei den übrigen Versuchen. In zwei Fällen traten bisher nicht gesehene Kristalle auf: die eine Art in einem Leeharn, bei etwa 70° schmelzend; die andere in einem Adalinharn schmolz über 130° und hatte schmetterlingsförmiges Aussehen. Ich konnte die beiden Formen wegen des wenigen Materials nicht näher bestimmen und habe sie auch sonst nie wieder gefunden.

Die Überlagerung der einzelnen Kristallarten war hier noch stärker wegen der reichlicheren Sublimate, so daß es noch viel schwieriger war, einen Überblick zu gewinnen und eventuell andere vorkommende Kristalle herauszufinden. Besonders häufig kamen der Harnstoff und die genannten Blättchen (Harnsäure?) vor, jedenfalls häufiger als in den ausgeschüttelten Urinen. Das kann daran liegen, daß sie infolge ihrer guten Wasserlöslichkeit bei der Ausschüttelung des Urins nur wenig

Neigung haben, in das Extraktionsmittel überzugehen. Sie tun es offensichtlich umso weniger, je besser der Äther oder das Chloroform entwässert werden. Bei einem Überblick fiel mir auf, daß Harnstoff und die Blättchen (Harnsäure?) immer zusammen vorkommen.

3. Ätherausschüttelung des angesäuerten, nicht eingeeengten Urins

— Isolierung des für Adalin charakteristischen Abbauproduktes

α - Äthyl - α - Oxybuttersäure —

Nachdem ich nun die am häufigsten, vor allem im Ätherextrakt des Urins nachweisbaren Kristalle untersucht hatte, versuchte ich abschließend unter Berücksichtigung der gemachten Erfahrungen, spezifische Adalinausscheidungsprodukte nachzuweisen.

Um eventuell mehr organische bromhaltige Substanzen zu bekommen, nahm ich fünf Tage lang täglich 1 g Adalin, denn infolge der geringen Kumulation, die ich im allgemeinen Teil erwähnte, läßt sich vielleicht bei längerdauernder Adalinmedikation eine stärkere Anreicherung im Urin erzielen. Am fünften Tag nahm ich 2 g Adalin auf einmal ein. Um den Urin zu konzentrieren, trank ich sehr wenig und sammelte nicht nur den Morgenurin, sondern auch die zweite und dritte Harnportion. Auf diese Weise konnte ich täglich 500 bis 600 cm³ Harn mit einem spezifischen Gewicht von 1030 bis 1040 bearbeiten. Nach der HCl-Ansäuerung schüttelte ich sobald als möglich aus, und zwar dreimal hintereinander mit der jeweils gleichen Menge Äther. Urin und Äther trennte ich sofort voneinander, während ich sie früher einen Tag lang stehen ließ. Nach 24 Stunden, während denen sich noch etwas Urin absetzte, versetzte ich den Äther wie üblich mit frisch geglühtem Na₂SO₄ und ließ ihn wiederum 24 Stunden stehen. Danach filtrierte ich ihn und dampfte vorsichtig mit dem Föhn ab. Es blieb, wie schon früher berichtet, ein Rückstand von wenigen cm³ kondensierten Wassers, das jedoch im Exsiccator in wenigen Tagen eintrocknete. Nach der Trocknung blieb die bekannte braune Schmiere. Da diese Schmiere bei der Vakuumsublimation starke Verunreinigungen macht, vermischte ich den Extrakt mit einer entsprechenden Menge geglühtem Na₂SO₄, so daß eine teigartige, hellbraune, trockene Masse entstand. Diese sublimierte ich wie üblich bei 120°, wobei ich im oberen Drittel mit einer Kühlschlange kühlte. Es zeigte sich bei den Extraktückständen der ersten vier Tage schon nach relativ kurzer Zeit **eine bisher noch nicht beobachtete Kristallart** in mäßiger Menge. In dem vom fünften Tag stammenden Extrakt, nach Einnahme von 2 g Adalin, war die Menge wesentlich größer: ein dichter Belag in der ganzen unteren Glashälfte und an der gekühlten Stelle des oberen Drittels. Das Überraschende war, daß das Sublimat infolge der Vermengung des Extraktückstandes mit Na₂SO₄ vollkommen rein von den sonst störenden braunen Tröpfchen war, so daß die Kristalle selbst im untersten Teil in reinem Weiß schimmerten. Ebenso überraschend war, daß sich keine der sonst üblichen Substanzen nachweisen ließ, auch nicht, wenn ich die Sublimationstemperatur erhöhte. Allerdings war der Schmelzpunkt bei einmaliger Mikrosublimation ungenau, was auf die Anwesenheit von anderen störenden Substanzen schließen ließ. **Erst nach zwei- bis dreimaliger Mikrosublimation war der Schmelzpunkt scharf begrenzt und betrug 76 bis 77°.** Ich konnte zwei verschiedene Modifikationen der Sublimation unterscheiden: in manchen Fällen, meist bei sehr langsamer Erwärmung, traten kleine Nadeln auf, die sich zu

parallekantigen Stäbchen mit abgeschrägten Enden vergrößerten. Bei sehr dichten Sublimaten entstand ein parkettbodenähnliches Aussehen. In den meisten Fällen bildete sich erst ein Flüssigkeitsbeschlag aus, in den langsam Kristalle einwuchsen, die ursprünglich gefiedert aussahen, dann aber immer mehr der oben beschriebenen Form glichen. Bei den anders gestalteten Formen des abgekühlten Sublimates handelte es sich meist um erstarrte Schmelze.

Durch Kontrollversuche überzeugte ich mich, daß diese Kristalle nicht von dem beigemengten Natriumsulfat herrühren konnten. Weder das reine Na_2SO_4 , noch eine entsprechende Mischung aus Na_2SO_4 und Leerharnextraktresten ergab das Vorliegen solcher Kristalle.

Die beschriebenen Kristalle scheinen hygroskopisch zu sein. Sie sind gut wasserlöslich, reagieren sauer und haben einen scharfen, beißenden Geschmack. Es ließen sich folgende kristalloptischen Daten feststellen: schmale, lange Rauten. Spitzer Winkel 72° . Schwache Doppelbrechung. Auslöschung parallel den Längskanten. Größere Doppelbrechung (γ) längs. Spaltbarkeit parallel der Längsachse. Dichroismus kräftig. In 45° zu den parallelen Nikols brauner Farbton. Optisch zweiachsig. Löst sich sehr gut in Zimtöl, ziemlich gut in Toluidin, etwas in Monobromnaphthalin. Sie lösen sich aber kaum in Paraffinöl. Paraffinöl ist also gut zur orientierenden Bestimmung der Brechungsindizes geeignet. Die Brechungszahl des verwendeten Paraffinöls (1,4691) liegt zwischen n_D' und γ' der Kristalle (Schmidt).

Es konnte mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich um ein spezifisches Adalinausscheidungsprodukt handelt. Besonders der Umstand, daß es eine Säure ist, die sich in Ölen gut löst, ließ darauf schließen, daß es vielleicht eine Fettsäure sein könnte. Es bestand die Möglichkeit, daß es sich um die Bromfettsäure handelt, die Schäfer, Filipi und Impens beschrieben haben und von der Filipi einen Schmelzpunkt von 88 bis 89° angibt.

Zur Kontrolle machte ich noch fünf Leerharnuntersuchungen, bei denen ich genau so vorging wie bei den Adalinharnen. Dabei fand ich sämtliche in der Arbeit beschriebenen Kristalle mit Ausnahme der bei 77° schmelzenden.

Nach Abschluß meiner Untersuchungen wurde von Schmidt in unserem Institut die Identifizierung der unbekannten Substanz durchgeführt, die sich als **α -Äthyl- α -Oxybuttersäure** erwies. Die Elementaranalyse, die infrarotspektrofotometrische Untersuchung, sowie der Vergleich einer synthetisch hergestellten α -Äthyl- α -Oxybuttersäure mit den obengenannten kristalloptischen Daten, sowie mit Sublimationsverhalten und Schmelzpunkt ergab einwandfreie Identität. In weiteren Versuchen von Schmidt und Burkdorf konnte die genannte Fettsäure bereits nach Aufnahme weniger Adalintabletten regelmäßig in den Harnextrakten gefunden werden, wobei nach Vakuumsublimation Schwierigkeiten für die Isolierung beim Vorhandensein von Benzoesäure in größeren Mengen auftreten konnten. Diese Schwierigkeiten sind aufgrund der guten Wasserlöslichkeit unserer Fettsäure im Gegensatz zur sehr schlechten Löslichkeit der Benzoesäure im kalten Wasser durch einfache Lösung der Sublimatfraktion im Wasser und durch erneute Extraktion zu beheben.

D. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit versuchte ich, Ausscheidungsprodukte des Adalins im Harn zu finden, und zwar nicht, wie es bisher meist geschah, durch den Bromnachweis, der bekanntlich unspezifisch ist, sondern durch direkte Darstellung der Kristalle, wie sie angeblich Schäfer, Filipi und Impens gefunden haben. Ich bemühte mich, in der Literatur Anhaltspunkte zu finden, um welche Stoffe es sich handeln könnte, in welcher Menge diese zu erwarten waren und vor allem, unter welchen Versuchsbedingungen mit der größten Ausbeute zu rechnen war. Besonders entsprechend den Arbeiten von Edler kam ich zu dem Schluß, daß dann am meisten Aussicht bestand, diese Stoffe im Harn zu finden, wenn die Versuchsperson längere Zeit, möglichst sechs bis sieben Tage lang, täglich wenigstens 1 g Adalin einnimmt. Infolge der Labilität des Adalins ist es wichtig, daß der Adalinharn nicht erwärmt wird und nicht lange bis zur Verarbeitung aufbewahrt wird, vor allem wenn seine Reaktion alkalisch ist. Für die Verarbeitung benützte ich eine Modifikation der von Walz angegebenen Methode. Sie besteht in der Ätherausschüttelung des angesäuerten Urins und der Trennung der Extrakt rückstände mittels Vakuumsublimation. Es gelang mir, den störenden Einfluß der braunen Schmiere im Extrakt rückstand dadurch auszuschalten, daß ich den Extrakt mit geglühtem Na_2SO_4 vermischte und dieses Gemisch sublimierte. Die sublimierten Kristalle waren dann frei von dem braunen Farbstoff.

Anfangs engte ich den Urin ein: erst durch Erhitzen auf dem Wasserbad, dann durch Gefrieren. In einer weiteren Versuchsreihe extrahierte ich den festen Rückstand des eingetrockneten Urins im Perforator. Die Extraktion erfolgte im wesentlichen mit Äther. Bei diesen Versuchen hatte ich nur jeweils einmal am Abend vorher 1 g Adalin genommen. Mit diesen Methoden konnte ich zwar zunächst keine im Adalinharn allein vorkommenden Stoffe nachweisen, jedoch fand ich fünf verschiedene Substanzen, die normalerweise bei der Äther- und auch Chloroformextraktion des Harns vorkommen und deren Kenntnis bei entsprechenden Arbeiten äußerst wichtig ist. Im Folgenden seien nochmals ihre wichtigsten Merkmale geschildert:

1. **Hippursäure:** F. 182 bis 183°. Spitze Nadeln, bzw. sehr lang und schmal ausgestreckte Blättchen mit angedeutet keilförmiger Konturierung, d. h. nahezu parallelen Längsseiten. Die Begrenzung der Schmalseiten ist unterschiedlich, aber nahezu 90°. Die Kristalle löschen bei gekreuzten Nikols kaum aus. Im Konoskop erscheint der Austritt einer Achse im Gesichtsfeld, meist aber nicht in der Mitte, sondern mehr am Rande. Die Farbringe umgeben den Achsenaustritt in vielen engen Isochromaten. n_D^{20} um 1,58. n_D^{25} zwischen 1,641 und 1,652.

2. **Benzoesäure:** F. 116 bis 118°. Sie entsteht vermutlich erst bei Temperaturen über 200° durch Zersetzung der Hippursäure. Unregelmäßig geformte, ziemlich dicke, harte, farblose und glasklar durchscheinende

Kristalle. In den Kristallen liegen achsengerecht Bläschen oder Tröpfchen. Monosymmetrisches Interferenzbild. Achsenaustritt in der Mitte des Gesichtsfeldes. Sehr schwache Doppelbrechung. Optisch zweiachsig. Brechung in beiden Richtungen zwischen 1,608 und 1,620.

Ein Zusammenhang zwischen Hippursäure- und Benzoessäureausscheidung mit der Adalinmedikation wurde aufgrund eigener Versuche und von Literaturangaben ausgeschlossen.

3. **Harnstoff:** Trotz der Vielgestaltigkeit der Kristallisationsformen sind in der starken Doppelbrechung charakteristische Erkennungsmerkmale gegeben. Es kann papierchromatographisch in einem Gemisch von Butanol, Ameisensäure, Wasser in einem Mischungsverhältnis von 12:1:7 leicht nachgewiesen werden.

4. Quadratische bis rechteckige Blättchen, die immer zusammen mit Harnstoff auftreten und stets in Flüssigkeit eingebettet sind. Der Schmelzpunkt ist nicht festzustellen, da sie sich ab etwa 140° in der Flüssigkeit lösen. Sie sind schwach doppelbrechend, praktisch isotrop. Hierbei handelt es sich vermutlich um **Harnsäure**.

Harnstoff und die vermutliche Harnsäure scheinen infolge ihrer Wasserlöslichkeit vor allem dann aufzutreten, wenn das Extraktionsmittel nicht vollständig entwässert wurde.

5. Eine unbekannte Substanz, die wegen ihrer sehr niedrigen Sublimationstemperatur von 25° nur schwer zu fassen war. Von dieser Substanz konnte zwar nicht die Natur der Verbindung bestimmt, jedoch einige kristalloptische Daten angegeben werden: unregelmäßige Dreiecke mit abgeschnittenen Spitzen. Sie liegen nicht in der Ebene des Glases, sondern stehen steil auf dem Glas. Starke Doppelbrechung. α quer zur Längsrichtung. Polarisationsfarben I. Ordnung. Monozentrisch. Vielfach verzwilligt. Zentrosymmetrisch. Optisch positive, einachsige Kristalle. Achsenaustritt im Gesichtsfeld am Rand. Die Kristalle sublimieren schon ab 25° und sind sehr flüchtig. Der Schmelzpunkt konnte daher nicht genau bestimmt werden. Er scheint zwischen 90 und 110° zu liegen.

Durch die Schilderung der wesentlichen Merkmale dieser fünf Stoffe ist es möglich, sich durch kurze Untersuchung davon zu überzeugen, ob es sich um einen der genannten Stoffe handelt, d. h. um normale Harnbestandteile, wenn man bei der Untersuchung von sauren Harnextrakten auf verdächtige Substanzen stößt.

6. Zuletzt machte ich einen weiteren Selbstversuch mit etwas größeren Adalinmengen und nahm vier Tage lang je zwei Tabletten, und am fünften Tag vier Tabletten Adalin. In den Harnextrakt rückständen, die bei saurer Extraktion mittels Ätherausschüttelung gewonnen wurden, erhielt ich nach Vakuumsublimation eine bisher nie beobachtete, vorerst unbekannte Substanz mit Säurecharakter, die nach Abschluß meiner Untersuchungen von Schmidt als **α -Äthyl- α -Oxybuttersäure** und als charakteristisches Adalinabbauprodukt identifiziert wurde. Der Schmelzpunkt betrug 76 bis 77°. Es handelte sich um zwei Kristallmodifikationen, wovon sich besonders eine, die stabilere, zur kristalloptischen Bestimmung eignete: schmale, lange Rauten. Spitzer Winkel 72°. Schwache Doppelbrechung. Auslöschung parallel den Längskanten. Größere Dop-

pelbrechung (γ) längs. Spaltbarkeit parallel der Längsachse. Dichroismus kräftig. In 45° zu den parallelen Nikols brauner Farbton. Optisch zweiaxsig.

Wie weitere Untersuchungen von Schmidt und Burkdorf ergeben haben, ist mit der Auffindung dieser Säure und mit ihrer Erkennung als charakteristisches Adalinabbauprodukt eine sichere Möglichkeit gegeben, durch Harnuntersuchung die Adalinaufnahme schon von therapeutischen Mengen an zu erkennen. Bisher war dies nicht möglich, da die Brombestimmung lediglich einen Hinweis auf eine bromhaltige Substanz geben konnte.

E. Literaturangaben

1. Authenrieth W.: Die Auffindung der Gifte 333 (1923)
2. Balázs J.: Sammlung von Vergiftungsfällen 4, 1 (1933)
3. Baumann E.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie 10, 131 (1886)
4. Bayer & Co.: Farbenfabr. Leverkusen DRP v. 10. 8. 17
5. Bunge G., Schmiedeberg O.: Jahresber. über d. Fortschritte der Chemie 975 (1877)
6. Burkdorf W.: Diss. Erlangen (noch nicht veröffentl.)
7. Edler W.: Diss. Bonn 1939
8. Filipi E.: Arch. d. Farmocol. speriment. 12, 233 (1911)
9. Filipi E.: Chem. Centralbl. II, 1468 (1911)
10. Genot C.: Journ. Pharmac. Belg. 8, 861 (1927)
11. Gensler P.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 77, (1914), 42 (1915)
12. Gerhartz H.: Sammlg. v. Vergiftungsf. 1, A. 26 (1930); 3, A. 238 (1932)
13. Grigassi: Orv. Hetil (ung.), 1931, Nr. 20
14. Hallmann L.: Klin. Chemie u. Mikrosk., Stuttgart 246 (1950)
15. Haberkann J., Reiche F.: Münch. Med. Wochenschr., Nr. 43, 1450 (1927)
16. Haberland G. L.; Bruns F. u. Altmann K.: Biochem. Zeitschr. 326, H. 2, 107 (1954)
17. Hoppe J. u. Seegers K.: Ther. d. Gegenw., 52, 454 (1911)
18. Impens E.: Med. Klin. 6, 1861
19. Impens E.: Ther. d. Gegenw., Nr. 4, 162 (1912)
20. Klimanek G.: Diss. Breslau 1926
21. Kofler L. u. A.: Mikromethoden, Innsbruck 1948
22. Kwan J.: Arch. intern. Pharmacodyn., 22, 331 (1913)
23. Liebig J.: Liebigs Ann. d. Chemie 50, 169 (1844)
24. Limpricht von Uslar: Liebigs Ann. d. Chemie 88, 133 (1853)
25. Redonnet T. A.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 84, 339
26. Redonnet T. A.: Chem. Centralbl. 1919 III, 72
27. Rosenmund K. W.: Ber. d. Deutsch. Gesellsch., H. 42, 4470 (1907)
28. Rosenmund K. W. u. Herrmann F.: Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch., 22, 96 (1912)
29. Salkowski E. u. H.: Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch., 12, 654 (1879)
30. Schäfer P.: Münch. Med. Wochenschr. 57, 2695 (1910)
31. Schmidt Gg.: Vortrag anlässlich der Ivers. d. Dtsch. Ges. f. Gerichtl. u. Soziale Med. am 26. 7. 55 in Düsseldorf
32. Walz K. E.: Diss. Erlangen, 1954
33. Weese H.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 181, 46 (1936)
34. Weismann: Jahresber. über d. Fortschr. d. Chemie 573 (1858)
35. Wichowski W.: Beitr. z. chem. Physiol. u. Path., 7, 265
36. Wojahn K.: Diss. Kiel, 1938
37. Wünsche F.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 84, 328

Lebenslauf

Am 23. Oktober 1928 wurde ich, Kurt Deisel, in Sulzbach-Rosenberg als Sohn des Bergmannes Karl Deisel und dessen Ehefrau Babette, geb. Renner, geboren. Nach vier Jahren Grundschule besuchte ich ab 1939 die Realschule in Sulzbach-Rosenberg und trat nach eineinhalbjährigem Wehrdienst als Luftwaffenhelfer 1946 in die Oberrealschule in Amberg über, wo ich am 14. Juli 1948 die Reifeprüfung ablegte.

Mein Medizinstudium begann ich im Frühjahr 1949 an der Hochschule in Regensburg und machte dort im Oktober 1951 meine ärztliche Vorprüfung. Anschließend, ab dem Wintersemester 1951/52, setzte ich mein Studium an der Universität Erlangen fort und beschloß dort mein Medizinisches Staatsexamen am 7. April 1954.

